

血清蛋白質のポーラログラフ的並びに電気泳動的研究

— 特に “Crossing Effect” を中心として —

佐々木忠男 淡川 舜平
梅谷直治 大原 弘通

札幌医科大学内科学教室 (指導 瀧本教授・和田教授)

Polarographic and Electrophoretic Studies on Plasma Proteins

— with Special Reference to the “Crossing Effect” —

By

TADAO SASAKI, SHUMPEI AWAKAWA, NAOJI UMETANI,
and HIROMICHI ÔHARA

Department of Internal Medicine, Sapporo University of Medicine
(Directed by Prof. S. TAKIMOTO & Prof. T. WADA)

1939年 Tropp¹⁾ は血漿のポーラログラフ第1反応において、血清蛋白の各分層はそれぞれ特有な最高の蛋白二重波を表わす至適濃度を有することを見出し、さらに溶液を稀釈して行くと遂にはII波の波高がI波より低下すること、即ち Crossing effect (以下Ce) の存在するを認め、その交叉する点即ち Crossing point (以下Cp) が蛋白分層によつてそれぞれ特有であるとした。即ち各分層のCpはアルブミンでは蛋白濃度0.0094%の点であり、グロブリンは0.02%強、フィブリノーゲンは0.02%弱であり、これ等の総和である血漿はその中間に位することを報告し、この方法により蛋白分層の鑑別が出来ること述べた。

かくの如く蛋白溶液をただ稀釈するというだけの簡単な操作で、Ceが認められること自体、蛋白波形成機構の上に興味があるが、私どもはさらにこれを動物実験上瀉血貧血並びに “Plasmapheresis” によつてCpがどのように変わるか、また各種疾患殊に、血清蛋白分層上かなり特異的な変化のみられるネフローゼ、肝硬変症、悪性腫瘍、栄養失調症等についてみて、如何なる態度が観察されるか、いわば in vivo の変化に相応して変化するCeが成立するか否かの問題に興味をもち実験を行つた。

実験方法

1. 動物実験

1) Plasmapheresis

- i) 動物はウイスター系白鼠 (150~200 g) を用いた。
- ii) 採血は頸静脈より行つた。凝血阻止剤としてはクエン酸ソーダを用い、この際それによる採取血液の稀釈を可及的小ならしめるため、濃厚クエン酸ソーダ溶液 (64%) で

注射筒内面をしめらす程度とし毎回2.0 ccを採血した。

iii) これを遠沈にかけ、得た血球は生理的食塩水で一度洗滌し、その後血球の生理的食塩水浮游液2.0 ccをつくり、再び頸静脈中に注入した。

iv) 上記操作により得た血漿を生理的食塩水にて、1.2, 1.4倍と順次稀釈し、その稀釈血漿を電解液20 cc中におおの0.1 cc宛を加える。電解液組成は0.008 M COCl_2 2.0 cc, 1N NH_4Cl 2.0 cc, 1N NH_4OH 2.0 cc, 蒸溜水14 ccの割合とした。

v) これ等稀釈血漿のおおのにつき、ポーラログラフ第1反応を行い、Troppに従つてCpを求めた。

vi) 同一白鼠につき Plasmapheresis を毎日連続4回行い、各回のCpの比較を行つた。

vii) 波高の測定は、コバルト極大波が終つて第I蛋白波が始るところより水平線を引き蛋白第I, II波の極大の中点よりこれに垂線を下し、その高さを以ておおの波高とした。

2) 瀉血貧血

i) 動物は前項と同一条件の白鼠を用い、毎回2.0 cc宛頸静脈より採血した。

ii) この場合は血球を戻す必要がないため、クエン酸ソーダを使用しない。従つて前者と異なる点は、前者は血漿についてのCpでありこの場合は血清でのCpを求めたことである。

iii) かくして得た血清を前と同様1.2倍、1.4倍と順次稀釈しCpを求めた。

iv) これを前と同様毎日連続4回行い、各回のCpの変化を比較した。

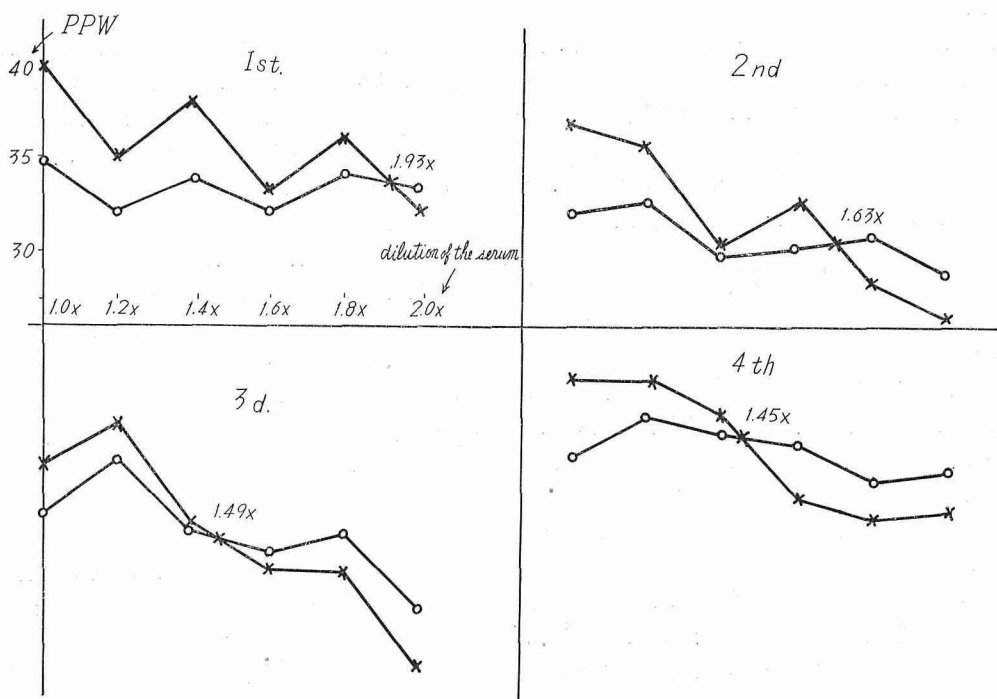


Fig. 1. Plasma pheresis

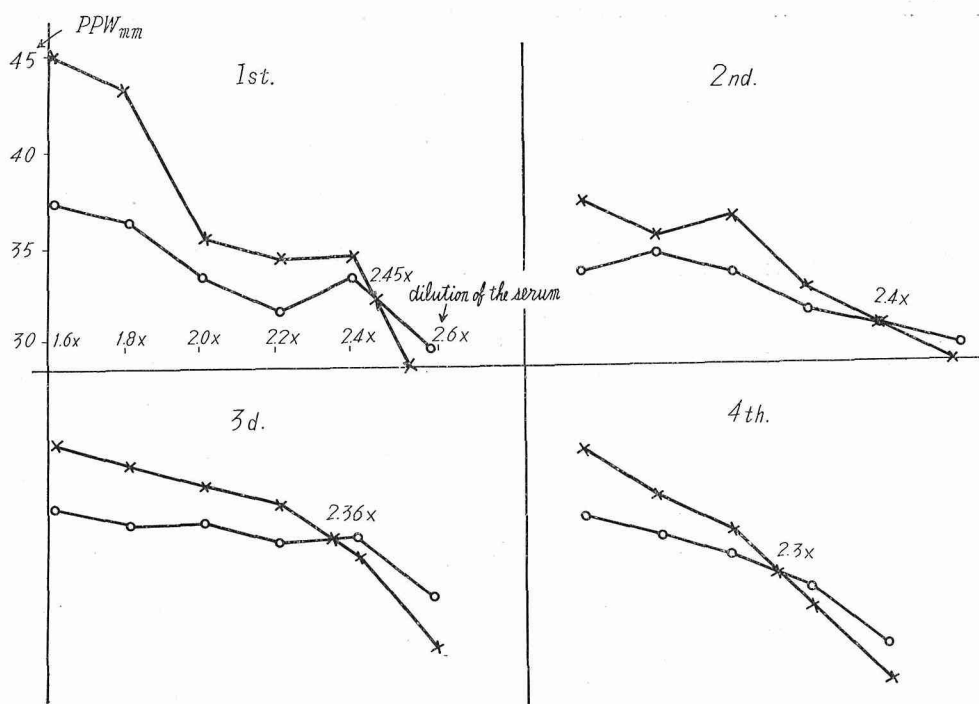


Fig. 2. Venepuncture

2. 臨床実験

臨床的低蛋白血症として、ネフローゼ、肝硬変症、栄養失調症、悪性腫瘍患者を選び、そのおのおのの血清につき同様に Cp を求めた。なおこの場合同時に血清蛋白質は電気泳動的に測定したが、日立製 H.T. 2 型マイクロセルを用い、試料は規定どおり M/20 phosphate buffer (pH 7.85, イオン強度 0.12) 中で泳動せしめ、面積測定は重量法を用いた。

実験成績

1. 動物実験

1) "Plasmapheresis"

Fig. 1 の如く第 1 回目の Cp は血漿原液の 1.93 倍の点であり、第 2 回目は 1.63 倍、第 3 回目は 1.49 倍、第 4 回目 1.45 倍と次第に目を重ねるに従って稀釈倍数の少ない方、即ち血漿原液に近い方へ Cp が移動して行くのを認めた。Table 1 は初回血漿と終回の血漿につき電気泳動的に調査したものである。これによると Plasmapheresis 操作によりアルブミンの減少、グロブリンの増加を来すことを認める。従つて Cp の移動は、かかる血漿蛋白分層内での変化に対応するものと思われ、アルブミン減少、グロブリンの増加して行くに伴つて、Tropp のいうグロブリン型に傾くものと解されよう。この際各回の Cp は血漿蛋白濃度を以て表わすべきであるが、Plasmapheresis においては血漿蛋白濃度に変化は起らず、各回の血漿蛋白濃度は硫酸銅法によつても差異は認めなかつた。

2) 瀉血貧血

この場合においても Fig. 2 に示す如く、第 1 回目 2.45 倍、第 2 回目 2.40 倍、第 3 回目 2.36 倍、第 4 回目 2.30 倍と Plasmapheresis の場合同様 Cp は蛋白濃度の濃厚な方に移動した。また Table 2 の如く電気泳動法によつても、前項同様アルブミン減少とグロブリン増加が認められた。

2. 臨床実験

人体については各疾患に特異性を表わすほどには敏感でないが、健康人、悪性腫瘍、ネフローゼでは殆ど差異を認めず、血清稀釈倍数にして 2.4~2.6 倍の間を示し、これら疾患別の一定の Cp は認められなかつた。しかし肝硬変症、栄養失調症ではその Point はアルブミン減少、グロブリン増加に平行して濃厚の側に傾くものの如く、血清稀釈倍数 1.8~2.0 倍の間を示した。

総括及び考按

Tropp は Cp に関して血漿蛋白分層の組成に特有であることを認め、アルブミンに比しグロブリンは蛋白濃度の遙かに濃い方へ傾くことを発表した。

われわれの実験的低蛋白血症における Cp も、漸次蛋白濃度の高い方へ移動する。これは先に述べた如く "Plasmapheresis" 或は瀉血貧血の回を重ねるに従いアルブミンは減少し、グロブリンは増加を示し、この蛋白分層の変動に相当して蛋白濃度の高い側、いわばグロブリン型に移行するものと解される。Plasmapheresis と瀉血貧血とを比較

Table 1. Correlation Between the Shifts of the Crossing point and of the Plasma Protein Pattern, by Plasmapheresis

	Cp.	TP.		Alb.	α -Glob.	$\beta + \phi$ -Glob.	γ -Glob.
Prior to Plasmapheresis	1.93×	7.24	% g/dl	61.4 4.66	7.6 0.55	19.3 1.40	11.4 0.83
After plasmapheresis	1.45×	6.66	% g/dl	59.0 3.93	11.4 0.7	17.5 1.7	11.6 0.79

Table 2. Correlation Between the Shifts of the Crossing point and of the Serum Protein Pattern by Venepunctures

	Cp.	TP.		Alb.	α -Glob.	β -Glob.	γ -Glob.
Prior to venepunctures	2.45×	7.44	% g/dl	99.3 5.15	7.0 0.51	17.1 1.27	6.5 0.48
After venepunctures	2.30×	6.85	% g/dl	62.9 4.31	13.9 0.95	8.7 0.60	14.2 0.97

するに Fig. 1, 2 に見る如く Plasmapheresis の Cp は蛋白濃度 1.93 倍より始め漸次さらに濃厚な側に、瀉血貧血の場合の Cp は前者より薄い 2.45 倍より始まっている。即ち“Plasmapheresis”の方が最初からかなりのグロブリン型を示しているのを認める。これは使用動物の個体差によるものか、或は血液凝固阻止作用として用いたクエン酸ソーダの影響によるものか、或は血漿と血清との相違に基づくものか、何れにしてもこれらの何れかの影響によるものと考えられる。クエン酸ソーダによる血漿の稀釈に関しては、初めよりこれを出来るだけ除くべく濃厚なものを少量用いているから殆ど無視し得ると考えられ、血漿と血清との相違を考えて見ると、フィブリノーゲンの有無という点になるが、フィブリノーゲンの Cp は前述の如く 0.02% 弱の点にあり、アルブミンに比して遙かに濃厚な側にある。従つて血漿は血清に比して濃厚な Cp を有する分層が比較的多いと考えられるから、その Cp は最初から血清より濃厚な側に存在するものといえよう。

以上動物実験による成績は Tropp の報告とよく一致し、*in vivo* の変化に相当して変化を示し、一応臨床応用の可能性がうかがえた。しかし臨床的低蛋白血漿については、認むべき疾患特有の Cp は得られなかつた。これは上記疾患では何れもアルブミン減少、グロブリン増加を来すか方法論的に見て各疾患相互間の微細な変動をも捕捉し得るほどには鋭敏な方法ではないためであろう。またたとえそれが出来たととしても、ポラログラフ蛋白波の I 波と II 波との関係は、電解液の相連や温度によつて多少の変動のあることが知られているから²⁾、臨床的にこれを鑑別診断上にまで応用を試みても可能性はないものと考えられる。

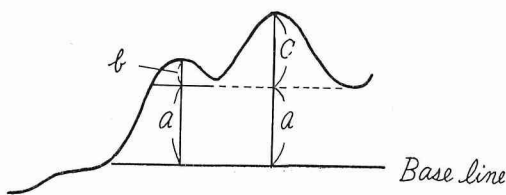


Fig. 3. Scheme of PPW

最後に Ce の起る意義について考察して見たい。われわれは通常 I 波及び II 波を表わすのに Fig. 3 の如く I 波は $(a+b)$ II 波は $(a+c)$ で表わしている。この場合極大波は拡散電流の特殊な型であり、拡散電流の定量の理論よりすれば II 波は c で表わされるべきものである。ここで a , b 及び c 各成分の変動について考察すると、I 波と II 波との半波電位は近いから蛋白濃度が高い中は、 b は水平線迄落ちることは出来ないで II 波に移行する。しかし極大波である関係上 b は常に零 (即ち拡散電流) より大きい。蛋白濃度

が次第に稀釈されて II 波形成に与る物質或は基が少なくなればなるほど、即ち c が小となればなるほど II 波の折出電位はより陰に移動する筈であるから、 b は却つて大きくなる可能性がある。従つて稀釈により減少する部分は a 及び c の部分であり b には先ず大きな変動はないと考えてよい。従つて稀釈により $b=c$ 或は $b>c$ となる点即ち Ce が現われることは考えられることである。これをグロブリンとアルブミンの Cp の相違について考察して見ると、上の論法によれば II 波形成物が少ないほど、Cp は稀釈倍数の少ない方、即ち濃厚な側に現われる筈である。Troopp³⁾ はポラログラフ第 1 反応の蛋白 II 波を蛋白分子内の SS 基、SH 基に基づくものであろうと推論した。Schoenbach⁴⁾ は電流滴定法によつて蛋白分層の SH 基を定量し、アルブミンは蛋白窒素当りグロブリンの 3~4 倍の SH 基を含有していると述べている。従つて II 波を SH 基に基づくものとすれば、Troopp のいう如くグロブリンがアルブミンより高濃度側に Cp を有していても矛盾はない。このことはポラログラフ第 1 反応蛋白波の II 波が SH 基に起因するということの間接に裏付けられるものであろう。

結 論

われわれは実験的並びに臨床的低蛋白血漿につき Tropp の Crossing effect を追試した。

1) “Plasmapheresis”

Cp は蛋白分層の移動に伴なつてグロブリン型を示し、同時に行つた電気泳動像上においても明かにアルブミン減少、グロブリン増加を認めた。

2) 瀉血貧血

この場合も前回同様グロブリン型を示したが、“Plasmapheresis”の場合と異なり Cp は全般に前者に比し、アルブミン型であつた。この両者の相違はフィブリノーゲンの存在の有無に基づくであろうことを推論した。

3) 臨床例

各種疾患の Cp による鑑別診断への応用は可能性に乏しい。

4) 本実験より Crossing effect 発現の機構について考察した。

(昭和 31. 4. 19 受付)

文 献

- 1) Tropp, C. et al.: Z. phys. Chem. **262**, 225 (1939).
- 2) 館: ポラログラフ—25 年記念講演集 **56** (昭).
- 3) Tropp, C. et al.: Z. physiol. Chem. **262**, 199 (1939).
- 4) Schoenbach, E. B. et al.: J. Clin. Invest **30**, 762 (1951).

Summary

The authors investigated the crossing points (Tropp) of experimental and clinical hypoproteinaemias, and obtained the following results:

1) Hypoproteinaemia induced by plasmapheresis.

Shifts of the protein fractions were accompanied by appearances of the crossing points of globulin-type. An apparent decrease of albumin, with an increase of globulin, was also demonstrable by an electrophoretical study carried out simultaneously.

2) Anaemia induced by repeated venepunctures.

Though indicated also to be of globulin-type, the crossing point type was rather closer to albumin-type than those observed by plasmapheresis. It was accordingly surmised that the difference of the crossing points between the two experiments might be attributed to the presence or absence of fibrinogen.

3) Clinical study.

Based on the crossing points observed in various diseases, it was noted that the observation of the crossing point are not applicable for differential diagnosis of diseases.

4) On the basis of the results of the present experiments, the authors have discussed the mechanisms of the "crossing effect".

(Received April 19, 1956)